

Исследование строения химических соединений, методы анализа и контроль производства

© Коллектив авторов, 2007

Л. Н. Грушевская¹, Б. М. Пятин¹, О. Б. Степаненко¹, Н. И. Авдюнина¹,
В. П. Лезина¹, В. И. Прокофьева²

РАЗРАБОТКА МЕТОДИК АНАЛИЗА ХЛОРИСТОВОДОРОДНОЙ СОЛИ КАРДИОЦИКЛИДА — НОВОГО ОТЕЧЕСТВЕННОГО АНТИАРИТМИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА III КЛАССА

¹ НИИ Фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, Москва;

² ММА им. И. М. Сеченова, Москва

Кардиоциклид, новый отечественный антиаритмический препарат III класса, был разработан в ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН. Целью настоящих исследований являлось изучение физико-химических свойств и разработка методик анализа субстанции хлористоводородной соли препарата — гидрохлорида N,N-дициклогексиламида N¹-(3-диэтиламинопропил)-N¹-(*para*-нитробензоил)аминоуксусной кислоты. Были получены ИК-, ЯМР ¹H и УФ-спектры кардиоциклида, изучена растворимость, определена температура плавления, потеря в массе при высушивании, прозрачность, цветность и pH растворов. Для определения чистоты субстанции использован метод тонкослойной хроматографии, количественное содержание кардиоциклида было определено методом неводного титрования.

В ГУ НИИ фармакологии РАМН им. В. В. Закусова было разработано новое антиаритмическое средство — кардиоциклид, представляющее собой гидрооксалат основания действующего вещества [1]. Результаты исследований физических и физико-химических свойств субстанции показали, что она мало растворима в воде [2]. Это обстоятельство затруднило создание устойчивой инъекционной лекарственной формы препарата, поэтому для дальнейшего изучения нового антиаритмического препарата была выбрана хлористоводородная соль основания кардиоциклида (кардиоциклида гидрохлорид, I), фармакологические свойства которой были ранее изучены в НИИ фармакологии совместно с германской фирмой Arzneimittelwerk Dresden GmbH [3].

По химическому строению препарат представляет собой гидрохлорид N,N-дициклогексиламида N¹-(3-диэтиламинопропил)-N¹-(*para*-нитробензоил)аминоук-

сусной кислоты. Структурная формула препарата представлена на рис. 1.

Целью настоящих исследований являлось изучение физико-химических свойств и разработка методов анализа субстанции I.

Экспериментальная часть

Субстанция I представляет собой мелкокристаллический порошок белого цвета с желтоватым оттенком, легко растворимый в воде, этиловом спирте, хлороформе, растворимый в диметилсульфоксиде, умеренно растворимый в изопропиловом спирте, мало растворимый в ацетоне и практически не растворимый в четыреххлористом углероде, толуоле, этилацетате, гексане.

Изучение физико-химических свойств водных растворов I показало, что цветность 1 % растворов не превышала эталон № 7б, мутность не превышала эталонный раствор 1, а значение pH находилось в пределах 5,9 – 6,6. Поскольку по результатам фармакологических исследований предполагается использовать 5 % инъекционные растворы препарата, нами были изучены физико-химические характеристики растворов I в этой концентрации. Цветность 5 % растворов препарата не превышала эталон 6б, мутность — эталонный раствор 1 и значение pH составляло 4,5 – 5,3.

ИК-спектры сняты на спектрофотометре Perkin-Elmer 580 (Швеция) в таблетках калия бромид, УФ-спектры — на спектрофотометре Spexord UV VIS (Германия), спектры ЯМР ¹H — на ЯМР-спектрометре AC-250 (Брукер) с использованием стандартного Брукерского пакета микропрограмм в ДМСО d₆, внутренний стандарт ТМС.

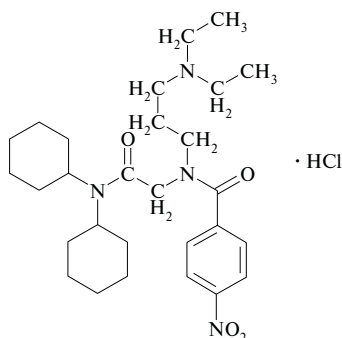


Рис. 1. Структурная формула кардиоциклида гидрохлорида.

Значения $R_f \times 100$ и параметры разделения кардиоциклида гидрохлорида и его технологических и неидентифицированных примесей (НП) в системе четыреххлористый углерод – этанол – концентрированный раствор аммиака (100:50:3) (сорбент Kieselgel 60 F₂₅₄)

IV	хлорид аммония (ХА)	III	Значение $R_f \times 100$							
			НП		V	I	VI	НП		II
			VII	VIII				IX	X	
3 ± 1	4 ± 1	9 ± 2	23 ± 7	29 ± 8	32 ± 7	57 ± 5	62 ± 5	67 ± 7	72 ± 5	73 ± 8
параметры разделения (η^* и DP ^{**})										
η (IV и ХА)		η (III и ХА)	η (VII и III)	η (VIII и VII)	η (V и VIII)	η (I и V)	η (VI и I)	η (IX и VI)	η (X и IX)	η (II и X)
0,3		2,0	7,0	2,0	0,7	1,8	0,3	1,3	1,3	0,3
DP = 0,93										

* коэффициент разделения, рассчитываемый как отношение произведения разности двух соседних зон адсорбции ($\Delta R_{f_{i-2}}$) на длину пробега системы растворителей (L) к полусумме длин продольного сечения соседних зон адсорбции ($1/2(l_1 + l_2)$): $\eta = \Delta R_{f_{i-2}} \times L / 1/2(l_1 + l_2)$.

** разделяющая способность системы (discriminative power), рассчитываемая по формуле: $DP = 1 - (2M / N \times (N - 1))$, где M — число сходных пар, для которых разница значений $R_f \times 100$ менее 5, а N — общее число исследуемых соединений.

Молекула I содержит ряд функциональных групп, четко идентифицируемых с помощью ИК и ЯМР ¹H спектроскопии.

ИК спектр (KBr, см⁻¹) содержит широкие полосы поглощения в области 2955 – 2860, обусловленные валентными колебаниями (асимметричные и симметричные) протонов — CH₂ и —CH₃ групп; полосы при 2700 – 2100 соответствуют валентным колебаниям N–H в R³N⁺H, колебания C=O амидных групп — в области 1630 – 1640, валентные колебания C=C связей бензольного кольца — в области 1600 – 1450. Колебания ароматической нитрогруппы проявляются в виде двух интенсивных полос при 1510 (асимметричные) и 1350 (симметричные). В области 1450 – 1300 наблюдаются полосы поглощения, обусловленные деформационными колебаниями —CH₂– и —CH₃ групп, а в области 1250 – 1020 — валентные колебания C–N связей и деформационные колебания C–C связей. Внеплоскостные деформационные колебания C–H бензольного кольца проявляются при 865 см⁻¹. Полоса поглощения при 840 свидетельствует о *para*-замещении в бензольном кольце.

В спектре ЯМР ¹H (в м. д.) присутствуют сигналы протонов всех фрагментов молекулы.

Наблюдается двойной набор полос, как следствие вращения вокруг третичной амидной связи (N-*para*-нитробензоил), среди которых характерными являются следующие: 1,25 (6H, т., CH₂CH₃); 1,20 – 2,45 (22H, м., 20H дициклогексила, 2H–N–CH₂–CH₂–CH₂–); 2,85 и 3,50 (4H, д. м., –N–CH₂–CH₂–CH₂–); 3,10 (4H,

д. кв., CH₂CH₃); 3,10 (2H, м., CH, CH дициклогексолов); 4,13 (2H, с., –CO–CH₂); 7,58 и 8,22 (4H, м., ArH); 10,35 (1H, с., –NH⁺). Отдельно выделяются сигналы, характерные для *cis*-изомера: 1,11 (6H, т., CH₂CH₃); 3,00 (4H, д. кв., CH₂CH₃); 4,32 (2H, с., –CO–CH₂); 7,69 и 8,34 (4H, м., ArH) и 10,40 (1H, с., –NH⁺). Интегрированием интенсивности сигналов ароматических протонов *trans*- и *cis*-изомеров их соотношение оценено как 75:25.

УФ-спектр кардиоциклида гидрохлорида, снятый в воде дистиллированной, в диапазоне длин волн 230 – 350 нм имеет один максимум поглощения в пределах 268 – 270 нм и минимум в пределах 236 – 238 нм. Удельный показатель поглощения ($E_{1\text{см}}^{1\%}$) 184; молярный показатель поглощения (ϵ) 9882.

На основании полученных экспериментальных данных для идентификации I были выбраны методы ИК- и УФ-спектроскопии.

Образцы субстанции I плавятся в интервале температур от 194,5 до 199,5 °С.

Потеря в массе при высушивании, определенная при 105 °С, не превышает 0,15 %.

Для оценки чистоты субстанции I был использован метод тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках силикагеля (Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck)). В соответствии со схемой синтеза I возможными примесями в его субстанции могут быть: N,N-дициклогексиламид хлоруксусной кислоты (II), *para*-нитробензойная кислота (III), 3-диэтиламино-1-пропиламин (IV), N,N-дициклогексиламид N¹-(3-диэтиламинопропил)аминоукс-

Способы и пределы обнаружения хроматографируемых веществ

Способ обнаружения	пределы обнаружения соединения, мкг					
	I	II	III	IV	V	VI
УФ-свет	0,02	0,1	0,01	...	0,8	...
Пары йода	0,9	0,5	...	0,03	0,1	0,08

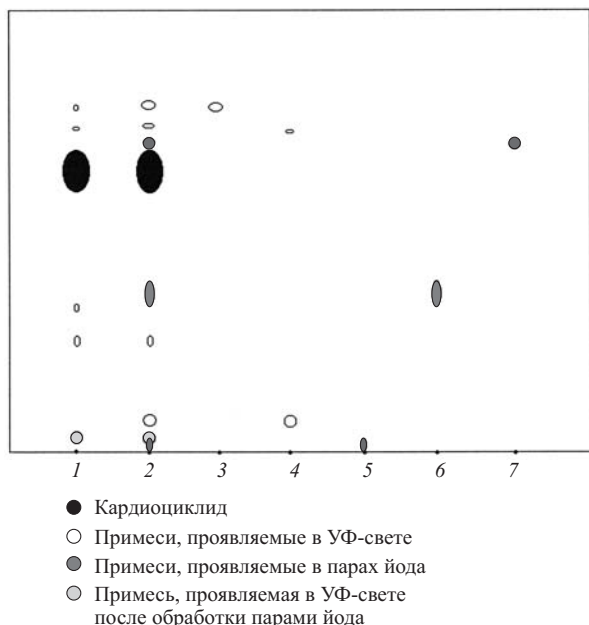


Рис. 2. Схема хроматограммы модельной смеси субстанции I и возможных технологических примесей: 1 — субстанция I; 2 — смесь субстанции I и возможных технологических примесей; 3 — N,N-дициклогексиламид хлоруксусной кислоты (II); 4 — пара-нитробензойная кислота (III); 5 — 3-диэтиламино-1-пропил-амин (IV); 6 — N,N-дициклогексиламид N¹-(3-диэтиламино-пропил)аминоуксусной кислоты (V); 7 — дициклогексиламин (VI)

сусной кислоты (V) и дициклогексиламин (VI). Для обнаружения веществ на хроматограмме были использованы оптические (флуоресценция в УФ-свете) и химические (пары йода) методы, поскольку соединения IV и VI не содержат хромофорных групп, а чувствительность обнаружения соединения V УФ-светом недостаточно высока.

В качестве подвижной фазы была использована система: четыреххлористый углерод – этанол – аммиака раствор концентрированный (100:50:3). Значения $R_f \times 100$ и параметры разделения исследованных соединений, а также идентифицированных примесей в субстанции в этой системе представлены в табл. 1. Для основного пятна значение $R_f \times 100$ составило 57 ± 5 , для пятен II, III, IV, V и VI значения $R_f \times 100$ составляли 73 ± 8 , 9 ± 2 , 3 ± 1 , 32 ± 7 , 62 ± 5 соответственно. На рис. 2 представлена схема хроматограммы образца субстанции I и модельной смеси I и его воз-

можных технологических примесей. На пластинку растворы соединений наносили из расчета 200 мг I и по 2 мкг каждой технологической примеси.

Пределы обнаружения исследованных веществ при хроматографировании в системе четыреххлористый углерод – этанол – аммиака раствор концентрированный (100:50:3) на пластинках Kieselgel 60 F₂₅₄ представлены в табл. 2.

Как видно из табл. 1, разница длин пробега некоторых пар соединений невелика, однако разные способы обнаружения соединений в этих парах, а также различный эффект их проявления позволяет идентифицировать каждое из известных соединений. Так $R_f \times 100$ зон адсорбции хлорида аммония и IV сходны, однако хлорид аммония в парах йода проявляется в виде круглого сероватого пятна, а IV — в виде коричневого пятна овальной формы. Две неидентифицированные примеси VII и VIII на хроматограмме субстанции I расположены рядом и проявляются в УФ-свете, однако из-за невысокого их содержания проявляются как два различных пятна. Соединения V и VIII проявляются различными способами, поэтому обнаружению друг друга не мешают. Зоны адсорбции пары I и VI в случае одновременного присутствия в пробе этих соединений также не сливаются. Исключение составляет лишь пара соединений X и II, проявляющихся в УФ-свете, разделения которых добиться не удалось. Соединение X является неидентифицированной примесью и присутствует в некоторых образцах субстанции, а соединение II — возможной технологической примесью. В процессе исследования было сделано предположение, что вещества X и II идентичны, однако подтвердить это предположение не удалось из-за низкого содержания примеси в субстанции.

В результате проведенных исследований было предложено проводить определение содержания посторонних примесей в субстанции по следующей методике: 0,02 г препарата растворяют в 1 мл хлороформа, 10 мкл (200 мкг) полученного раствора наносят на предварительно обработанную в указанной ниже системе растворителей хроматографическую пластинку Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck). Рядом в качестве свидетелей наносят по 10 мкл 0,004, 0,002 и 0,0005 % хлороформных растворов стандартного образца (PCO) I (0,4, 0,2 и 0,05 мкг соответственно). После нанесения проб пластинку высушивают на воздухе в течение 10 мин,

Таблица 3

Результаты количественного определения кардиоциклоида гидрохлорида методом неводного титрования

Параметр	Серия				
	1	2	3	4	5
Количественное содержание (%)	$\bar{X} = 99,75$	$\bar{X} = 99,90$	$\bar{X} = 99,53$	$\bar{X} = 99,73$	$\bar{X} = 99,82$
Метрологические характеристики ($P = 95 \%, n = 5$)	$S = 0,1619$	$S = 0,1540$	$S = 0,1757$	$S = 0,1958$	$S = 0,1608$
	$S\bar{x} = 0,0724$	$S\bar{x} = 0,0689$	$S\bar{x} = 0,0786$	$S\bar{x} = 0,0876$	$S\bar{x} = 0,0719$
	$\Delta\bar{X} = 0,2000$	$\Delta\bar{X} = 0,1915$	$\Delta\bar{X} = 0,2184$	$\Delta\bar{X} = 0,2417$	$\Delta\bar{X} = 0,2000$
	$\bar{\epsilon} = 0,20 \%$	$\bar{\epsilon} = 0,19 \%$	$\bar{\epsilon} = 0,22 \%$	$\bar{\epsilon} = 0,24 \%$	$\bar{\epsilon} = 0,20 \%$

помещают в насыщенную камеру с указанной выше системой растворителей и хроматографируют восходящим способом. По достижении фронтом растворителя расстояния, равного 10 см от линии старта, пластинку извлекают из камеры, сушат на воздухе до отсутствия запаха растворителей и просматривают в УФ-свете (Хроматоскоп 3М). Пятна возможных примесей на хроматограмме испытуемого раствора сравнивают по величине и интенсивности свечения со шкалой свидетелей. Кроме основного пятна I и пятна хлорида аммония ($R_f \times 100$ около 4), при просматривании в УФ-свете на хроматограмме возможно наличие дополнительных пятен.

Далее пластинку помещают в камеру, насыщенную парами йода, на 15 мин. На хроматограмме после обработки парами йода дополнительных пятен, кроме основного пятна I и пятна хлорида аммония, который проявляется в парах йода в виде серого пятна на желтоватом фоне, быть не должно.

Анализ образцов I показал, что в 200 мкг субстанции присутствуют неидентифицированные примеси с $R_f \times 100$ около 23, 29, 67 и 73, обнаруживаемые в УФ-свете. Полуколичественное определение их содержания было проведено в сравнении со шкалой свидетеля I. Содержание каждой неидентифицированной примеси во всех испытуемых образцах не превышало 0,2 %, а сумма примесей не превышала 1 %. Технологических примесей III, IV, V и VI в образцах субстанции препарата обнаружено не было.

Количественное содержание I было определено методом неводного кислотно-основного титрования в среде ледяной уксусной кислоты и ацетата окисной ртути (25:5). Конечную точку титрования определяли по переходу индикатора кристаллического фиолетового и потенциометрически. Содержание основного вещества составляло 99,6 – 99,9 %.

Количественное определение I проводили по следующей методике: около 0,4 г (точная навеска) препара-

та растворяли в 25 мл уксусной кислоты (ч. д. а.), добавляли 5 мл ацетата окисной ртути в ледяной уксусной кислоте (ГФ XI) и титровали 0,1 М раствором хлорной кислоты. Конечную точку титрования определяли потенциометрически или добавляли 0,1 мл раствора индикатора кристаллического фиолетового и титровали до появления голубовато-зеленой окраски. 1 мл 0,1 М раствора кислоты хлорной соответствует 0,053713 г $C_{28}H_{44}N_4O_2 \cdot HCl$.

Потенциометрическое титрование осуществляли при помощи иономера ЭВ-74 с использованием стеклянного и хлорсеребряного электродов. Скачок потенциала в конечной точке титрования составлял около 70 мВ, что соответствовало переходу окраски индикатора кристаллического фиолетового от голубой до голубовато-зеленой.

Результаты количественного определения I методом неводного титрования обработаны статистически и представлены в табл. 3.

Предварительный срок хранения I определяли методом “ускоренного старения” при температуре 60 °С [4]. По истечении срока, эквивалентного 2 годам хранения в естественных условиях, исследуемые образцы по качеству не отличались от исходных образцов.

Таким образом, нами были впервые изучены физико-химические свойства I, а также разработаны методы его анализа.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. Зауер, Р. Шиндлер, К. Рюгер и др., Патент РФ № 2134683, *Бюл. Изобрет.*, № 23 (1999).
2. Л. Н. Грушевская, Н. И. Авдюнина, О. Б. Степаненко и др., *Хим.-фарм. журн.*, **37**(12), 51 – 54 (2003).
3. H. Poppe, R. Schindler, W. Sauer, et al., *Arch. Pharm. Med. Chem.*, **332**(7), 223 – 241 (1999).
4. *Временная инструкция по проведению работ с целью определения сроков годности лекарственных средств на основе метода “ускоренного старения” при повышенной температуре И42-8-82*, Минздрав СССР, Москва (1982).

Поступила 11.10.05

DEVELOPING METHODS FOR THE ANALYSIS OF NEW ANTIARRHYTHMIC CLASS III DRUG CARDIOCYCLIDE IN HYDROCHLORIDE FORM

L. N. Grushevskaya¹, B. M. Pyatin¹, O. B. Stepanenko¹, N. I. Avdyunina¹, V. P. Lezina¹, and V. I. Prokof'eva²

¹ Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

² Sechenov Medical Academy, Moscow, Russia

The physicochemical properties of cardiocyclide, a new original class III antiarrhythmic agent, have been studied. Methods for the of analysis of cardiocyclide hydrochloride salt, N-(3-diethylaminopropyl)-N-para-nitrobenzoyl)-aminoacetic acid dicyclohexylamide hydrochloride, have been developed. The IR, ¹H NMR, and UV spectra of cardiocyclide were obtained and the solubility, melting point, water loss on drying, transparency and color of solutions, pH of aqueous solutions, and chromatographic purity (thin-layer chromatography) have been determined. The method of quantitative assay is based on the nonaqueous acid – base titration.